

# Biologische Kontrolle von ausgewählten *Fusarium*-Arten mit bakteriellen Antagonisten an Spargel



B. Berndt<sup>1</sup>, M. Goßmann<sup>1</sup>, H. Junge<sup>2</sup>, C. Büttner<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, seit 15.09.2009 vorübergehender Sitz: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen, Königin-Luise-Str. 19, 14195 Berlin, phytomedizin@agr.hu-berlin.de <sup>2</sup> Abitep GmbH, Glienicke Weg 185, D-12489 Berlin

## DUAL-KULTUREN VERSUCHE MIT PATHOGEN UND ANTAGONIST



### Methode

Es wurde eine Bakteriensuspension mit  $2,5 \times 10^8$  cfu in autoklaviertem Wasser hergestellt. Die Pathogene wurden 10d nach Überimpfung auf SNA mit Hilfe von Korkbohrern auf Waksman-Agar überimpft. Die Bakterien wurden in definierter Entfernung von den Pathogenen überimpft. Die Inkubation erfolgte bei 15°C bzw. 20°C DD.

Varianten auf 25 Platten mit je zwei Wiederholungen:  
*Fusarium proliferatum* 241 jeweils mit B.a. und UK  
*Fusarium proliferatum* 227 jeweils mit B.a. und UK  
*Fusarium oxysporum* 155 jeweils mit B.a. und UK  
*Fusarium oxysporum* 378 jeweils mit B.a. und UK  
*Fusarium redolens* 318 jeweils mit B.a. und UK  
*Fusarium redolens* 371 jeweils mit B.a. und UK



F. redolens am Tage der Bakterisierung, links UK

Die Bonituren erfolgten jeweils 7d, 14d, 21d und 28d. Gemessen wurde die Hemmung des Wachstums beim Pilzpathogen durch den bakteriellen Antagonisten an Hand der Ausbreitung des Pilzmyzels zwischen dem Impfstückrand und den Myzelsaum.

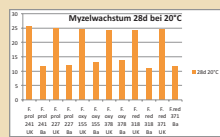
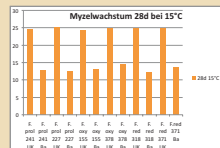


F. proliferatum, UK F. proliferatum, B.a. F. oxysporum, UK F. oxysporum, B.a. F. redolens, UK F. redolens, B.a.

### Beschreibung der Boniturmittelwerte der Dual-Kulturenversuche bei 15°C und 20°C

Die sechs *Fusarium*-Isolate unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit ggü. *Bacillus amyloliquefaciens* bei gleicher Temperatur signifikant nur 7d nach Überimpfung.

Unterschiedliche Hemmwerte zeigen sich vor allen zwischen den verschiedenen Isolat bei *Fusarium proliferatum* und *F. oxysporum*. 14d 28d liegt eine signifikante Hemmung des Myzelwachstums aller getesteten *Fusarium*-Isolate durch *B. amyloliquefaciens* bei ungefähr 50% des Myzels vor (t-test, p=0,05). Die hemmende Wirkung von *B. amyloliquefaciens* auf *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* und *F. redolens* ist bei Inkubationsbedingungen von 20°C stärker ausgeprägt als bei 15°C.



### Problematik

Phytopathogene Arten der Pilzgattung *Fusarium* verursachen z. B. bei Spargel (*Asparagus officinalis*) wirtschaftlich bedeutsame Wurzel-, Kronen- und Stängelfäulen. Einige davon sind potenzielle Mykotoxinbildner, die eine ernst zu nehmende Gesundheitsgefährdung für Menschen und Tiere darstellen. Spargel ist in Deutschland eine der wichtigsten Gemüsekulturen, bei der phytopathogene Pilze, insbesondere *Fusarium*-Arten, zunehmend zur Ertrags- und Qualitätsminderung führen.

## GWH-VERSUCH IM TRITROPHISCHEN SYSTEM: PATHOGEN, ANTAGONIST UND WIRT



### Methode

Entsprechende Varianten des Saatgutes der Spargelsorte „Ramos“ wurde bakterisiert durch Tauchen des Saatgutes in 0,2%-ige Bakteriensuspension vor der Aussaat und danach durch Gießen mit 0,4%iger Suspension ( $2,5 \times 10^8$  cfu/ml). Die Infektion der Spargelpflanzen erfolgte durch Tauchen der Wurzeln 1 h in Sporensuspension ( $10^7$  Sporen/ml). Die Pflanzen wurden nach Bedarf gewässert und mit 1% Wuxal Super 30 ml pro Pflanze gedüngt und angeestigt. Die Temperaturen betragen 24-25°C mit einer Nachtabsenkung von 20-22°C.

### Folgende Varianten wurden erstellt:

*Fusarium proliferatum*, ohne und mit B.a.  
*Fusarium oxysporum*, ohne und mit B.a.  
*Fusarium redolens*, ohne und mit B.a.  
 UK, ohne und mit B.a.



Symptomstufe 0 Symptomstufe 2 Symptomstufe 4

### Regelmäßige Boniturtermine:

10 dpi, 17 dpi, 24 dpi, 33 dpi, 41 dpi, 47 dpi, 53 dpi

- Symptome am Wirt,
- Biomasse (Triebanzahl) der Wirtspflanzen,
- Biomasse (max. Trieblänge) der Wirtspflanze.

54 dpi wurde das FG Triebe und Wurzeln von zufällig ausgewählten Spargelpflanzen ermittelt und die entsprechenden Pflanzenteile bei -20°C für eine Reisolation des Pilzpathogens zurückgestellt. Weiterhin wurden die meisten Versuchspflanzen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und das TG der gesamten Pflanze ermittelt.

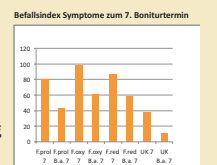
### Symptombonitur modifiziert nach Martinez:

- 0= Symptomlos,
- 1= leicht chlorotisch, vereinzelt Spitzen der endständigen Phyllokladien vergilbt oder Spitzen welk,
- 2= mittel chlorotisch, Phyllokladien fast vollständig hellgrün bis gelb, einzelne Triebteile welk,
- 3= schwer chlorotisch, auch die Stängel gelblich verfärbt, Ausfall großer Triebteile durch Welke,
- 4= Nekrotisch, Pflanze abgestorben, ganze Pflanze welk.

### Beschreibung der Boniturmittelwerte des Infektionsversuches im GWH

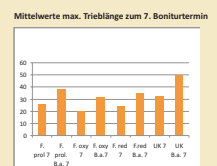
#### Symptombonitur:

*F. oxysporum* 155 verursacht bei den unbakterisierten Pflanzen eine stärkere Symptomausprägung als *F. proliferatum* 241 und *F. redolens* 318. Der Befall durch *F. redolens* 318 manifestiert sich am ersten Boniturtermin durch die geringste Symptomausprägung, verglichen mit den anderen beiden Isolat. Die bakterisierten Varianten zeigen eine signifikant verminderte Symptomausprägung. Die Symptomausprägung ist bei den mit *F. proliferatum* infizierten Pflanzen bei den späteren Boniturterminen am geringsten, bei *F. oxysporum* etwas stärker als bei *F. redolens* (Wilcoxon-Test, Bonferroni-Adjustierung mit p x 120).



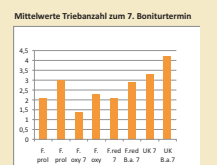
#### Mittelwerte max. Trieblänge:

Am stärksten wirkt sich *F. oxysporum* 155 auf die Reduktion der max. Trieblänge aus. Verglichen mit der Kontrolle zeigen alle infizierten unbakterisierten Varianten eine deutlich verminderte maximale Trieblänge gegenüber der nicht bakterisierten UK. Die Reduktion der max. Trieblänge ist bei den mit *F. oxysporum* infizierten Varianten auch im bakterisierten Zustand am stärksten, während die Unterschiede zwischen *F. proliferatum* und *F. redolens* eher gering sind. Die bakterisierte UK weist am 7. Boniturtermin deutlich die höchsten Mittelwerte der max. Trieblänge auf (t-Approxiamtion).



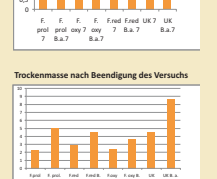
#### Mittelwerte Triebanzahl:

Auch hier deutet sich eine starke Schädigung von *F. oxysporum* an, sowohl bei den bakterisierten als auch bei den nicht bakterisierten Pflanzen. Alle bakterisierten Pflanzen weisen eine signifikant höhere Triebanzahl am siebenten Boniturtermin auf als die nicht bakterisierten Pflanzen. Das gilt auch für die UK's (Man-Whitney-U-Test).



#### Mittelwerte Trockengewicht:

Bei den nicht bakterisierten Varianten mindern alle drei *Fusarium*-Arten gegenüber der UK das Trockengewicht. Das Trockengewicht der bakterisierten UK ist signifikant erhöht gegenüber der nicht bakterisierten UK sowie gegenüber allen anderen Varianten. Die bakterisierte Variante mit *F. redolens* zeigt gegenüber den anderen bakterisierten Varianten den geringsten Zuwachs an Trockengewicht, weist aber gegenüber der unbakterisierten Variante von *F. redolens* ein erhöhtes Trockengewicht auf (Tukey's Studentized Range, p=0,05).



## FREILANDVERSUCH MIT BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS UND ENTEROBACTER RADICINCITANS



### Vorarbeiten

Es wurden zwei Versuchsflächen auf dem Gelände der landwirtschaftlich-gärtnerischen Fakultät vermessen und der Pilzstatus lichtmikroskopisch ermittelt. Die Versuchsflächen wurden in 0-30 cm, 30-60 cm und 60-90 cm Bodentiefe auf pH-Wert, Bodenart und Hauptnährstoffgehalt untersucht. Vor Auspflanzung wurden 100 zufällig ausgewählte Pflanzen nach Gewicht und *Fusarium*-Befallsymptomen bonitiert. Es wurden jeweils drei fünf cm lange Wurzelanschnitte zurückgestellt zur weiteren Ermittlung des Pilzausgangsstatus bei den Versuchspflanzen. Die Versuchsflächen wurden gedüngt und die Reihen auf 50 cm tief aufgelockert. Vor der Auspflanzung wurden Streifen aus Plastikfolie bis 50 cm tief in den Boden ausgebracht, um eine Migration und Vermischung der beiden Bakterienarten zu unterbinden.

Die Bakterisierung erfolgte durch Tauchen und Giessen der entsprechenden Varianten in 0,05 g Bakterienpulver mit *Enterobacter pro* 100 Pflanzen und 5 ml Bakteriensuspension mit *B. amyloliquefaciens* pro 100 Pflanzen. Pro Variante gibt es auf jedem Versuchsfeld vier Wiederholungen (teilerandomisiert jeweils in kompakten Blöcken) á 25 Pflanzen. Im äußeren Bereich wurden weitere 200 Pflanzen gleichmäßig verteilt gepflanzt, um den Randeffect zu minimieren. Die Spargelpflanzen wurden nach Bedarf mit Entec gedüngt. Es wurde kontinuierlich manuelle Unkrautbekämpfung durchgeführt.



### 14 Varianten á 100 Pflanzen auf jeder Versuchsfläche (S8 und CII):

- 111 und 211 S8 CII, *Bacillus*, Tauch- und Gießapplikation
- 112 und 212 S8 CII, *Bacillus*, Tauchapplikation
- 113 und 213 S8 CII, *Bacillus*, Gießapplikation
- 121 und 221 S8 CII, *Enterobacter*, Tauch- und Gießappli.
- 122 und 222 S8 CII, *Enterobacter*, Tauchapplikation
- 123 und 223 S8 CII, *Enterobacter*, Gießapplikation
- 130 und 230 S8 CII, UK



### Fazit und Ausblick

In vitro manifestierte sich die antifungale Wirkung von *B. amyloliquefaciens* gegenüber *Fusarium* spp. in einer makroskopisch signifikant wahrnehmbaren Verdrängung des Pilzpartners auf dem Nährboden, sowohl bei 15°C Inkubationstemperatur als auch bei 20°C. Zur Untersuchung des zeitlichen Rahmens der Applikation wären weitere in-vitro-Versuche auch mit niedrigeren Temperaturen sinnvoll. In dem Gewächshausversuch zeigte sich bei bakterisierten Spargelpflanzen sowohl eine deutliche Kompensation von durch *Fusarium* spp. verursachten Schädigungen, als auch eine allgemeine Förderung der Biomasseproduktion. Auch hier wären weitere Versuche unter veränderten abiotischen und biotischen Bedingungen (z. B. Temperaturen, Infektions- bzw. Konkurrenzdruck im Substrat) sinnvoll. Der Freilandversuch wird erst im 2011 an Hand einer Endbonitur auszuwerten sein.

### Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Andrea Klinke, Gabi Budruss, Renate Junge, Klaus Bröcker und Helmuth Berndt.